

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006019

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-103684  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 3 6 8 4

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 3 6 8 4

出 願 人  
Applicant(s): 森永乳業株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P-C40178
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C07H 15/24 A61P 3/10
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市城南区神松寺一丁目9番20号
【氏名】	樋口 隆一
【発明者】	
【住所又は居所】	福岡県福岡市東区青葉六丁目26番2号
【氏名】	稲垣 昌宣
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都港区芝五丁目33番1号 森永乳業株式会社内
【氏名】	早澤 宏紀
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 生物 科学研究所内
【氏名】	山田 宗夫
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 生物 科学研究所内
【氏名】	田中 美順
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 生物 科学研究所内
【氏名】	三澤 江里子
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 生物 科学研究所内
【氏名】	脇元 式子
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 生物 科学研究所内
【氏名】	伊藤 洋介
【特許出願人】	
【識別番号】	000006127
【氏名又は名称】	森永乳業株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100100549
【弁理士】	
【氏名又は名称】	川口 嘉之
【選任した代理人】	
【識別番号】	100090516
【弁理士】	
【氏名又は名称】	松倉 秀実
【選任した代理人】	
【識別番号】	100089244
【弁理士】	
【氏名又は名称】	遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

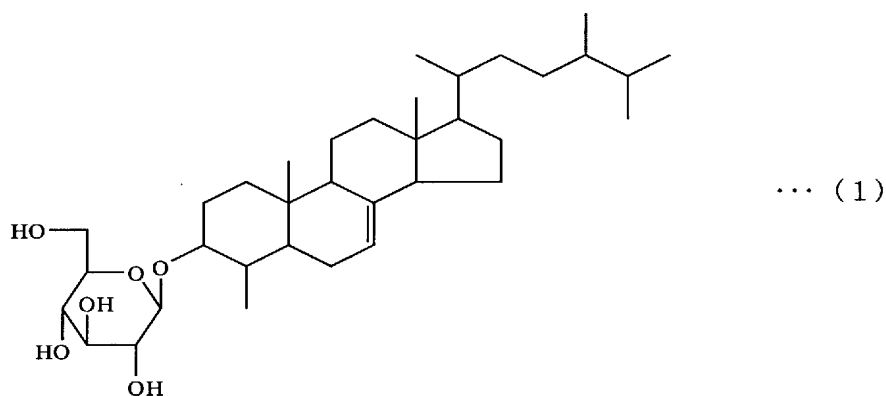
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

下記化学式（1）で示される構造をもつ化合物。

【化 1】



【請求項 2】

請求項 1 に記載の化合物を、乾燥重量で 0.1 質量％以上含む組成物。

【請求項 3】

ユリ科植物の抽出物又はその分画物である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の化合物又は請求項 2 もしくは 3 に記載の組成物を有効成分として含む、高血糖改善剤。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の高血糖改善剤を含む医薬又は飲食品。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の化合物又は同化合物を含む組成物の製造方法であって、ユリ科植物に属し、請求項 1 に記載の化合物を含む植物もしくはその一部又はそれらの破砕物から、同化合物を含む画分を有機溶媒又は熱水を用いて抽出、濃縮することを特徴とする方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オール骨格を有する配糖体及び高血糖改善剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オール骨格を有する新規配糖体3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オール及びそれを含む組成物、並びにこれらを含む医薬又は飲食品に関する。

【背景技術】

【0002】

4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールは、植物中に存在する物質であることが知られている（非特許文献1）。しかし、この化合物における先行技術については、同化合物に類似の構造を有するロフェノール（4-メチルコレスト-7-エン-3-オールの立体異性体の一つ）の生合成系に関するもののみであり（非特許文献2）、これらの化合物の用途については全く未知のものであった。

【0003】

ユリ科アロエ属は、アロエベラ（*Aloe barbadensis* Miller）やキダチアロエ（*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger）等を含む植物群で、様々な効能があることが経験的に知られており、アロエ属植物の用途に関する先行技術には、免疫修飾性多糖類（特許文献1）、アロエ抽出物のブタノール画分又はアロインを含有することを特徴とする免疫抑制改善剤（特許文献2）、HSP60ファミリーに属するタンパク質のアロイン誘導体含有合成抑制剤（特許文献3～5）、アロエ葉皮由来のレクチン活性蛋白質（特許文献6）などがある。

【0004】

アロエ属植物の血糖値改善に関する先行技術としては、米国での臨床試験（非特許文献3）や、動物での血糖値降下作用（非特許文献4および非特許文献5）、アロエ属植物中の多糖類（特許文献7）が開示されているが、これら先行技術では、アロエ属植物の血糖値降下作用成分は、多糖類又は糖たんぱく質と予測されていた。また、アロエベラ圧搾液及び該圧搾液を有効成分とする血糖値降下剤（特許文献8）では、FT-IRチャートにおけるエステル基特有のピークが活性と相関し、有効成分は多糖類、アミノ酸、りんご酸等と開示されている。

【0005】

尚、アロエベラ葉皮には、緩下作用を持つバロバロインやアロエエモジンが含まれており、従来、産業上好ましくないとされていた。

【0006】

ヘモグロビンA1cは、グルコースとヘモグロビンの結合物で、糖濃度に依存して高血糖の程度に応じて増加し、一度生成されたヘモグロビンA1cは、赤血球寿命（120日）が尽きるまで消滅しないので、過去の長期間の血糖コントロール状態を反映する（非特許文献6）。ヘモグロビンA1cは、1996年から老人健康法の基本健康審査の選択検査に採用され、1999年の糖尿病の新診断基準においては、糖尿病の補助的な診断指標として採用されていることから、臨床的に大きな意義がある指標と考えられる（非特許文献7）。

【0007】

高血糖の状態が持続すると、グルコース特異的インスリン分泌不全とインスリン抵抗性が認められ、高血糖をさらに悪化させる要因となってなる（非特許文献8）。高血糖状態から糖尿病の発症を予防する為には、長期的な血糖値のコントロールが必要であることより、ヘモグロビンA1cの値の上昇を抑制することが必要となってくると考えられる。前糖尿病（糖尿病として疑われる状態）における、血糖値のコントロールを行う為に、食事療法や、運動が推進されている。食後の血糖値上昇を押さえるための機能性食品（特定保健用食品）には、様々なものが既に販売されているが、いずれも一過性の血糖値上昇抑制効

果に過ぎない。よって、長期間にわたる血糖値のコントロールまでは、期待できるものではなく、今回のヘモグロビンA1c低下作用物質の開発が切望されていた。

【0008】

また、現在、糖尿病の治療薬としては、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤、インシュリン分泌促進剤としてスルホウレア薬や、インシュリン抵抗性改善薬としてチアゾリシン誘導体などが医薬品として用いられている。しかしその薬効は満足するものでなく、また急激に血糖が下がることにより昏睡状態を引き起こす副作用などの問題も多い。

【0009】

以上の状況から、低血糖を引き起こさず安全に摂取でき、かつ、ヘモグロビンA1c値を低下させる長期血糖値コントロール作用を持つ物質の発見が切望されていた。

従来、先行技術文献には、血糖値の上昇を抑制する効果を有するものとして、例えば、バナバに由来する成分を含む血糖値上昇抑制剤（特許文献9）、麦類発酵物の濃縮エキスを有効成分とする血糖値上昇抑制剤（特許文献10）等が開示されている。

【0010】

また、先行技術文献には、トリテルペン配糖体を有効成分とする技術としては、例えば、ギムネマイノドラムより抽出された配糖体を有効成分とする糖尿病の予防剤（特許文献11）、バナバより抽出されたコロソリン酸を有効成分として含む代謝改善方法およびそのための組成物（特許文献12）、リパーゼ阻害剤（特許文献13）、免疫抑制活性を有するトリテルペン誘導体（特許文献14）、インスリン作用増強組成物（特許文献15）が開示されている。また血糖降下剤として、24-アルキルコレステレン-3オン及び24-アルキルコレスタン-3オンからなる群から選ばれる化合物が開示されている（特許文献16）。

【0011】

類似構造物である4-メチルスチグマスト-7-エン-3-オール骨格を有する配糖体としては、3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルスチグマスト-7-エン-3-オールが瓜科の植物であるブリトニー（*Bryonia alba*）に含まれていることが報告されている（非特許文献9）が、一般的に食経験がある植物とは言えず、また全合成の例もない。

【特許文献1】特開2001-520019号公報

【特許文献2】特開平8-208495号公報

【特許文献3】特開平10-120576号公報

【特許文献4】特開平10-045604号公報

【特許文献5】特開平10-036271号公報

【特許文献6】特開平09-059298号公報

【特許文献7】特開昭60-214741号公報

【特許文献8】特開2003-286185号公報

【特許文献9】特開2003-95941号公報

【特許文献10】特開2002-371003号公報

【特許文献11】特開平05-247086号公報

【特許文献12】特開2002-205949号公報

【特許文献13】特開平09-40689号公報

【特許文献14】特表平11-511482号公報

【特許文献15】特開平10-330266号公報

【特許文献16】特開2002-48837号公報

【非特許文献1】ケミ、ファム、ブル（*Chem. Pharm. Bull.*）、第624～626ページ、1993年

【非特許文献2】バイオケミカ バイオケミカ アクタ（*Biochemica Biophysica Acta*）、第63～88ページ、2000年

【非特許文献3】フィトメデシン（*Phytomedicine*）、第3巻、第245～248ページ、1996年

【非特許文献4】フィトセラピー リサーチ (Phytotherapy Research)、第15巻、第157～161ページ、2001年

【非特許文献5】フィトセラピー リサーチ (Phytotherapy Research)、第7巻、第37～42ページ、1993年

【非特許文献6】日本臨床、通巻第748号、第1巻、第615～617ページ、1999年

【非特許文献7】日本臨床、通巻第808号、第2巻、第405～409ページ、2002年

【非特許文献8】矢崎義雄・村松正寛監修、「糖尿病の最前線」、第126～139ページ、羊土社、1997年

【非特許文献9】ヒーマヤ プリロードヌイフ サエヂネーニイ (Khimiya Prirodnykh Soedinenii)、第3巻、ソ連、1977年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、低血糖を引き起こさず安全に摂取でき、かつ、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>値を低下させる、長期血糖値コントロール作用を持つ新規化合物の提供である。本発明の他の課題は、食経験上安全に摂取でき、かつ、入手容易な原料から、産業上好ましくない成分を含まず、かつ、前記化合物を有効量含む組成物を製造する方法の開発である。

【課題を解決するための手段】

【0013】

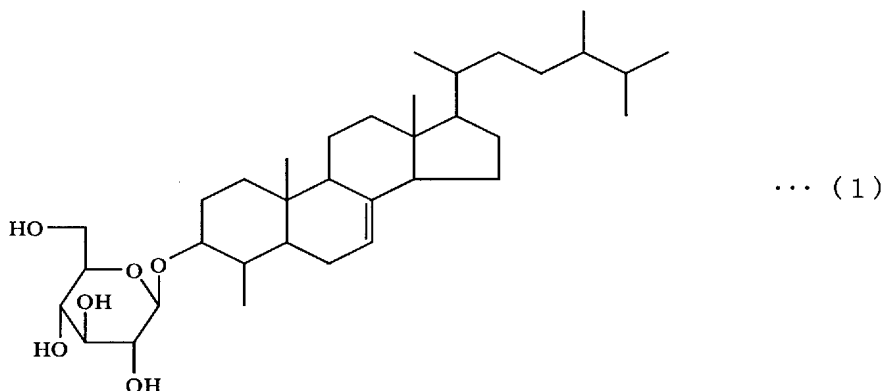
本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、アロエベラ (Aloe arborescens Miller) の葉肉 (透明ゲル部分) から抽出、精製した新規配糖体である、3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールが、低血糖を引き起こさず安全に摂取でき、かつ、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>値を低下させる長期血糖値コントロール作用を持つことを見出した。本発明は、上記の知見に基づき完成されたものである。

【0014】

すなわち本発明は、下記化学式(1)で示される構造をもつ化合物 (以下、「本発明の化合物」ともいう。) である。

【0015】

【化1】



【0016】

また本発明は、本発明の化合物を、乾燥重量で0.1質量%以上含む組成物 (以下、「本発明の組成物」ともいう) を提供する。本発明の組成物は、ユリ科植物の抽出物又はその分画物であることを好ましい態様としている。

また本発明は、本発明の化合物又は本発明の組成物を有効成分として含む、高血糖改善剤 (以下、「本発明の薬剤」ともいう) を提供する。



#### 【0017】

また本発明は、前記高血糖改善剤を含む医薬又は飲食品を提供する。

本発明はさらに、本発明の化合物又は本発明の組成物の製造方法であって、ユリ科アロエ属に属し、請求項1に記載の化合物を含む植物もしくはその一部又はそれらの破砕物から、同化合物を含む画分を有機溶媒又は熱水を用いて抽出、濃縮することを特徴とする方法を提供する。

#### 【発明の効果】

#### 【0018】

本発明の化合物は、低血糖を引き起こさず安全に摂取でき、かつ、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>値を低下させる、長期血糖値コントロール作用を持つ。また、本発明の組成物は、食経験上安全に摂取でき、入手容易な植物であるユリ科植物、例えばアロエ属又はアリウム属植物を使用して製造することができる。また、本発明の組成物は、本発明の化合物を有効量含むものであり、好ましい態様では、医薬又は飲食品として好ましくない成分であるバルバロインあるいはアロエエモジンを含まない。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0019】

次に、本発明の好ましい実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の好ましい実施形態に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することができるものである。

#### 【0020】

本発明の化合物は、前記化学式(1)で表される構造をもつ化合物、すなわち3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールである。すなわち、本発明の化合物は、4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールの3位の水酸基と、D-グルコースの1位の水酸基が脱水縮合した構造を有している。

#### 【0021】

また、本発明の組成物は、本発明の化合物を、乾燥重量で0.1質量%以上、好ましくは5質量%以上、より好ましくは15質量%以上含む、ユリ科植物の抽出物又はその分画物である。本発明の組成物に含まれる本発明の化合物の含有量の上限は特に制限されないが、50質量%、もしくは70質量%、又は90質量%が例示できる。

#### 【0022】

本発明の化合物又はそれを含む組成物は、例えば、ユリ科に属し、本発明の化合物を含む植物もしくはその一部又はそれらの破砕物から、同化合物を含む画分を有機溶媒又は熱水を用いて抽出、濃縮することにより、製造することができる。

#### 【0023】

前記ユリ科に属する植物としては、アロエ属又はアリウム属に属する植物が挙げられる。アロエ属植物としては、アロエベラ (*Aloe barbadensis* Miller)、アロエフェロックスミラー (*Aloe ferox* Miller)、アロエアフリカーナミラー (*Aloe africana* Miller)、キダチアロエ (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger)、アロエスピカータベイカー (*Aloe spicata* Baker) 等が挙げられる。本発明の化合物又はそれを含む組成物の製造においては、前記植物の全体を用いてもよいが、葉肉(透明ゲル部分)を用いることが好ましい。このような植物又はその一部を、好ましくはホモジナイザー等を用いて破砕して液状化し、有機溶媒又は熱水で抽出する。有機溶媒としては、メタノール、エタノール、ブタノール等のアルコール；酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル等のエステル；アセトン、メチルイソブチルケトン等のケトン；ジエチルエーテル、石油エーテル等のエーテル；ヘキサン、シクロヘキサン、トルエン、ベンゼン等の炭化水素；四塩化炭素、ジクロロメタン、クロホルム等のハロゲン化炭化水素；ピリジン等の複素環化合物、エチレングリコール等のグリコール；ポリエチレングリコール等のポリアルコール；アセトニトリル等のニトリル溶媒、及びこれらの溶媒の混合液等が挙げられる。また、これらの溶媒は無水であってもよく、含水状態であってもよい。これらの溶媒の中では、酢酸エチル／ブタノール混合液(3:1)が好ましい。

#### 【0024】

抽出方法としては、通常の植物生物の抽出に用いられる方法を用いることができる。通常、新鮮な植物又は乾燥植物1質量部に対し、有機溶媒1〜300質量部を用いて、攪拌又は振盪しながら、溶媒の沸点以下の温度で加熱還流するか、常温で超音波抽出する方法が挙げられる。抽出液は、濾過又は遠心分離等の適当な方法により、不溶物を分離して粗抽出物を得ることができる。

#### 【0025】

粗抽出物は、各種クロマトグラフィー、例えば順相又は逆相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、精製することができる。順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、溶出溶媒としてクロロホルム／メタノール混合液のグラジエントを用いると、クロロホルム：メタノール＝5：1程度で本発明の化合物が溶出される。また、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいては、溶出溶媒としてメタノール／水混合液のグラジエントを用いると、95％程度の濃度のメタノールで本発明の化合物が溶出される。

得られたフラクションは、さらにHPLC等により精製することができる。

#### 【0026】

上記のようにして得られる化合物又はそれを含む組成物が、本発明の化合物を含むことは、例えば、後述の実施例に示す方法によって確認することができる。例えば、アグリコン部にグルコースが結合した配糖体であることは、また、アグリコン部が4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールであることは、 $^{13}\text{C}$ -NMR等によって確認することができる。

#### 【0027】

本発明の化合物は、D-グルコースと、4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを縮合させることによって、製造することができる。4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールは、植物より抽出および精製を行うことによって入手することができる。D-グルコースと、4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールの縮合は、例えば、第4版実験化学講座26、1992年（第272頁、第297頁、及び第342頁に記載）、に示している方法を組み合わせて行うことができる。すなわち、D-グルコースを完全アセチル化後、アノマー位を $\alpha$ -ブロミドに変換する。ジエチルエーテル中、4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを $\alpha$ -ブロミドと反応させて $\beta$ -グリコシル化した後、ナトリウムメトキシド・メタノール中でアセチル基を加水分解し、目的化合物を得る。

#### 【0028】

本発明の化合物は、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>の値を低下させる作用を有し、その結果、長期間血糖値をコントロールすることができる。したがって、高血糖改善剤の有効成分として使用することができる。

#### 【0029】

また、従来、アロエベラの葉皮には、緩下作用を持つバルバロインやアロエエモジンが含まれており、医薬又は飲食品として好ましくないと考えられている。一方、本発明の組成物は、好ましい態様においては、食経験上安全に摂取できるアロエベラの葉肉（透明ゲル部分）から抽出、分画することによって得ることができるため、バルバロインあるいはアロエエモジンが含まれず、かつ、本発明の化合物を有効量含む。したがって、本発明の組成物も、高血糖改善剤の有効成分として好適である。

#### 【0030】

本発明の化合物又は組成物は、そのまま本発明の薬剤として利用することが可能である。また、本発明の組成物は、溶液であってもよく、常法により凍結乾燥または噴霧乾燥して粉末として保存、使用することもできる。

#### 【0031】

本発明の薬剤は、本発明の化合物又は組成物、若しくはこれらを製剤学的に許容される製剤担体と組み合わせて、経口的、又は非経口的にヒトを含む哺乳動物に投与することができる。尚、本発明の薬剤において、本発明の化合物は医薬に許容される塩にすることが

できる。医薬に許容可能な塩として、金属塩（無機塩）と有機塩との両方が含まれ、それらのリストは「レミントン・ファーマシューティカル・サイエンシーズ（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第17版、第1418ページ、1985年」に掲載されているものが例示される。具体的には塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、二リン酸塩、臭化水素酸塩および硫酸塩などの無機酸塩や、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩、サリチル酸塩及びステアリン酸塩などの有機酸塩が非限定的に含まれる。また、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム等の金属の塩、リジン等のアミノ酸との塩とすることもできる。また、上記化合物もしくはその医薬上許容される塩の水和物等の溶媒和物も本発明に含まれる。

#### 【0032】

本発明の薬剤の製剤形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、貼付剤、点眼剤、点鼻剤等を例示できる。製剤化にあたっては製剤担体として通常の高血糖改善剤に汎用される賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、注射剤用溶剤等の添加剤を使用できる。また、本発明の効果を損わない限り、本発明の化合物又は組成物と、他の高血糖改善作用を有する薬剤とを併用してもよい。

#### 【0033】

本発明の薬剤中に含まれる本発明の化合物又は組成物の量は、特に限定されず適宜選択すればよいが、例えば、本発明の化合物の量として、製剤中に0.001～10質量%、好ましくは0.01～1質量%とするのがよい。

本発明の薬剤は、高血糖状態により引き起こされる疾患、例えば糖尿病及び前糖尿病（糖尿病として疑われる状態）の治療又は予防に有用である。特に、高血糖状態から糖尿病の発症を予防するために用いることもできる。尚、高血糖状態とは、正常領域以外の状態であり、正常領域とは、一般的には空腹時血糖値 $110\text{ mg/dl}$ 以下で、75g糖負荷後の1時間での血糖値 $160\text{ mg/dl}$ 以下および2時間での血糖値 $120\text{ mg/dl}$ 以下と規定している状態である（日本臨床、通巻第806号、第1巻、第28～35ページ、2002年）。また、本発明の薬剤は、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>の値が健常人値より高い状態、例えば、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>の値が5.8%以上である患者に対する治療に好適に用いられる。

#### 【0034】

本発明の薬剤の投与時期は特に限定されず、対象となる疾患の治療方法に従って、適宜投与時期を選択することが可能である。また、投与形態は製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、患者の症状の程度等に応じて決定されることが好ましい。

#### 【0035】

本発明の薬剤の有効成分の投与量は、用法、患者の年齢、性別、疾患の程度、その他の条件等により適宜選択される。通常有効成分としての本発明の化合物の量は、好ましくは $0.01\sim 10\text{ mg/kg/日}$ 、より好ましくは、 $0.1\sim 1\text{ mg/kg/日}$ での範囲となる量を目安とするのが良く、また、本発明の組成物を用いる場合は、組成物の乾燥重量として好ましくは $0.1\sim 1000\text{ mg/kg/日}$ 、より好ましくは、 $1\sim 100\text{ mg/kg/日}$ となるような量を目安とするのが良い。いずれの場合は、1日1回又は複数回に分けて投与することができる。

#### 【0036】

本発明の薬剤、又はその有効成分である本発明の化合物又は組成物は、飲食品に含有させることもできる。飲食品としては、前記有効成分の効果を損なわない限り特に制限されず、前記有効成分を含有させること以外は、通常飲食品に用いられる原料を用いて通常の方法によって製造することができる。

#### 【0037】

前記飲食品は、高血糖を改善するためとの用途が表示された飲食品、例えば「高血糖改

善用と記載された、高血糖改善剤を含有する飲食品」、あるいは「高血糖改善用と記載された、アロエベラ抽出物を含有する飲食品」、等として販売することが好ましい。尚、本発明の化合物又は組成物は、高血糖改善作用を有することから、血糖上昇を抑制する効果を有すると考えられる。したがって、本発明の飲食品は、血糖上昇抑制用を使用することができる。前記高血糖改善用とは、このような血糖上昇抑制用であってもよい。

#### 【0038】

前記「表示」とは、需要者に対して上記用途を知らしめるための全ての行為を意味し、本発明の飲食品に係る商品又は商品の包装に上記用途を記載する行為、商品又は商品の包装に上記用途を記載したものを譲渡し、引き渡し、譲渡若しくは引渡しのために展示し、輸入する行為、商品に関する広告、価格表若しくは取引書類に上記用途を記載して展示し、若しくは頒布し、又はこれらを内容とする情報に上記用途を記載して電磁気的方法により提供する行為、等が例示できる。

#### 【0039】

しかしながら、表示としては、行政等によって認可された表示（例えば、行政が定める各種制度に基づいて認可を受け、そのような認可に基づいた態様で行う表示）であることが好ましく、例えば、特定保健用食品（健康増進法施行規則（平成15年4月30日日本国厚生労働省令第86号））としての表示（特に保健の用途の表示）が最も好適である。

なお、以上のような表示を行うために使用する文言は、「高血糖改善用」という文言のみに限られるわけではなく、それ以外の文言であっても、高血糖を改善する効果を表す文言であれば、本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。そのような文言としては、例えば、「血糖上昇抑制用」が挙げられる。

#### 【実施例】

##### 【0040】

次に実施例を示して本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

##### 【0041】

##### 【製造例1】

以下、アロエベラからの3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オール（3-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-4-methylergosterol）の製造例を示す。

##### 【0042】

アロエベラから、3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを、以下に示すようにして抽出、精製した。

##### 【0043】

アロエベラの葉肉（透明ゲル部分）100kgを、ホモジナイザーを用いて液状化し、ここに100Lの酢酸エチル・ブタノール混合液（3：1）を添加して攪拌した。1晩放置した後、酢酸／ブタノール混合液と水層を分液して、酢酸エチル・ブタノール混合液を回収した。この酢酸エチル・ブタノール混合液を減圧下濃縮して得られた、酢酸エチル・ブタノール混合液抽出物の重量は、13.5gであった。

上記水層及び酢酸エチル・ブタノール混合液抽出物を用いて、後述する糖尿病モデルマウスを用いた高血糖改善作用の評価を行ったところ、酢酸エチル・ブタノール混合液抽出物に同作用が認められたので、この抽出物中の成分の分離、精製を試みた。まず、前記抽出物を薄層クロマトグラフィー（メルク社製、シリカゲル60F254及びRP-18F2543）により検討した結果、クロロホルム／メタノール混合液を用いた順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離方法が適切であると考えられた。そこで、シリカゲル60（メルク社製）を400g充填したカラムに、前記抽出物13gを1mlのクロロホルム／メタノール混合液（1：1）に溶解させた溶液を流してカラムに吸着させた後、クロロホルム／メタノール混合液を使用し、メタノール濃度を段階的に上昇させるステップワイズグラジエント法（クロロホルム：メタノール＝100：1、25：1、10：1、5：1及び1：1の各混合比）により溶出し、前記混合液の混合比毎に溶出液を分画した。各フラクションの溶媒除去後の粗精製物収量は、それぞれ1.44g、3.0g、1

・ 17 g、1.28 g、2.27 gであった。これらのフラクションのうち、クロロホルム：メタノール＝5：1で溶出されたフラクション（粗精製物A）に活性成分が存在することを、前記モデル動物を用いた方法で確認した。また、薄層クロマトグラフィーで分析したところ、バルバロインおよびアロエエモジンの存在は確認されなかった。

#### 【0044】

さらに、上記粗精製物Aから活性成分の分離精製を行うため、この粗精製物Aを薄層クロマトグラフィー（メルク社製、シリカゲル60F254及びRP-18F2543）を用いて検討したところ、メタノールを用いた逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離方法が適切であると考えられた。そこで、上記粗精製物Aを1mlのクロロホルム／メタノール混合液（1：1）に溶解させ、コスモシル140（ナカライテスク社製）を180g充填したカラムに流してカラムに吸着させた後、メタノール85%溶液、600ml、メタノール95%溶液、600ml、メタノール100%、100mlで、順次溶出した。3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールは、95%メタノールの溶出フラクションに濃縮分離されており、その溶媒除去後の重量は370mgであった。以下、このものを化合物1という。

#### 【0045】

化合物1を、薄層クロマトグラフィーの検討を行った結果、β-シトステロールグルコシドにきわめて近いRf値を示すことから、アグリコン部に糖が1分子結合している配糖体であることが予測された。さらに化合物1の糖組成について調べる為、化合物1を、メタノリシス後、TMS誘導体として、GC-MSを用いた測定を行った。その結果、化合物1の糖部分のTMS誘導体を測定した場合のメインピークは、リテンションタイム14.28min, 14.61min, 16.34minに見られ、標品グルコース（ナカライテスク社製）のメインピークである14.27min, 14.60min, 16.33minとほぼ一致した。また標品ガラクトース（キシダ社製）および標品キシロース（キシダ社製）のメインピークに該当するピークは見られなかった。よって、化合物1に含まれている糖の種類は、グルコースであることが確認された。以上の結果より、化合物1はアグリコン部にグルコースが1分子結合している配糖体であることが推定された。しかし化合物1を<sup>13</sup>C-NMR（125MHz、CDCl<sub>3</sub>）にて測定した結果、夾雑物の存在が確認されたため、構造決定にはさらなる精製が必要と考えられた。そこで、化合物1をメタノリシスした後、アセチル化してアグリコン部の構造、およびアグリコン部と糖との結合部位の確認を行った。以下その方法を示す。

#### 【0046】

50mgの化合物1を5%塩酸を含むメタノール（50ml）に溶解した後、6時間加熱還流してメタノリシスした後、乾燥させて残渣を得た（約30mg）。当該残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：クロロホルム／9：1）で精製して化合物2（10mg）を得た。当該化合物2（5mg）に無水酢酸・ピリジン（各2滴）を加えて70℃で30分加熱してアセチル化した後、反応液の溶媒を留去して、化合物3を得た。当該化合物3を、GC-MSおよび、<sup>13</sup>C-NMR（125MHz、CDCl<sub>3</sub>）にて分析を行った結果を、各々図1および図2に示す。測定条件及び結果は、以下の通りである。また、標準物質として用いた3-アセトキシ-4-メチルエルゴスト-7-エンは、アロエより抽出精製した後、<sup>13</sup>C-NMRにて構造を確認した後、アセチル化して製造した。

#### 【0047】

（<sup>13</sup>C-NMRスペクトル（δ values, in CDCl<sub>3</sub>））；C-1:36.8, C-2:27.3, C-3:78.7, C-4:37.0, C-5:46.9, C-6:26.8, C-7:117.4, C-8:139.4, C-9:49.7, C-10:34.9, C-11:21.6, C-12:39.7, C-13:43.6, C-14:55.1, C-15:23.1, C-16:28.2, C-17:56.3, C-18:12.0, C-19:14.2, C-20:36.5, C-21:19.0, C-22:33.9, C-23:30.6, C-24:39.1, C-25:32.6, C-26:20.4, C-27:18.4, C-28:15.6, C-29:15.3

#### 【0048】

（GC-MS）

装置：GC-17A/GCMS5050A (SHIMADZU)

GCカラム：NEUTRA BOND-5 (GL Sciences)

カラム温度:100℃(2分)→(10℃/分)→300℃(28分)

注入温度:250℃,

キャリアガス:He (1.3mL/分)

インターフェイス温度:300℃

MSモード:EI

イオン化エネルギー:70eV

【0049】

(結果)

標準物質:3-アセトキシ-4-メチルエルゴスト-7-エン:tR [min]=39.4; m/z 456 [M]<sup>+</sup>, 441 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 396 [M-AcOH]<sup>+</sup>, 381 [M-CH<sub>3</sub>-AcOH]<sup>+</sup>

化合物3:tR [min]=39.2; m/z 456 [M]<sup>+</sup>, 441 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 396 [M-AcOH]<sup>+</sup>, 381 [M-CH<sub>3</sub>-AcOH]<sup>+</sup>

【0050】

NMRの測定結果より、化合物3は3-アセトキシ-4-メチルエルゴスト-7-エンの文献値と一致した(油化学、第36巻、第5号、第301~319ページ、1987年)。この結果より化合物2は4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールであることが分かった。またFAB-MSを用いた測定の結果、化合物1の分子量は576であった。化合物2(アグリコン部)とグルコースを脱水縮合した場合、得られる化合物の分子量は、414(化合物2)+180(グルコース)-18(水)=576となり、化合物1の分子量と一致した。以上の結果より、化合物1の構造は、3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールであることが明らかとなった。以下それぞれの分子式、分子量、化学式を示す。

【0051】

(化合物1)

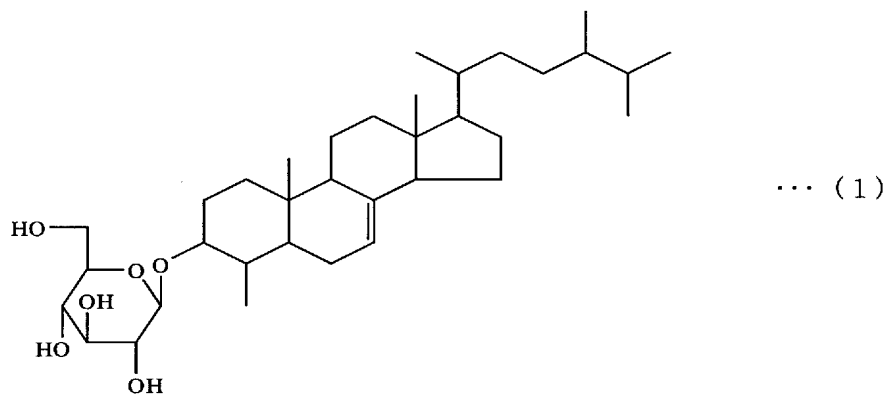
分子式:C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>

分子量:576

化学式:下記化学式(1)

【0052】

【化2】



【0053】

(化合物2)

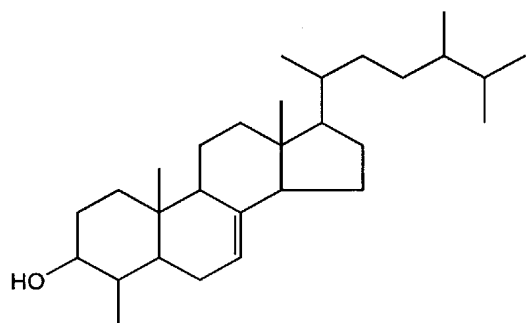
分子式:C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O

分子量:414

化学式:下記化学式(2)

【0054】

【化3】



… (2)

【0055】

(化合物4)

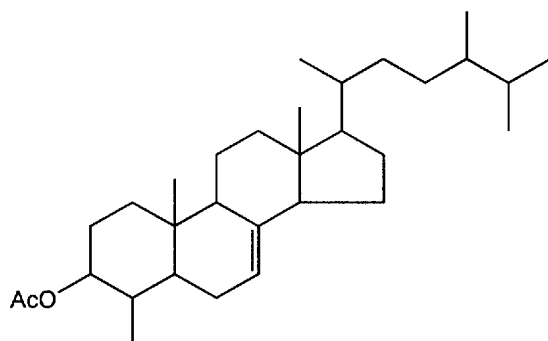
分子式：C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>

分子量：456

化学式：下記化学式(3)

【0056】

【化4】



… (3)

【0057】

【製造例2】

アロエベラの葉肉（透明ゲル部分）を加熱乾燥し、粉碎した乾燥アロエベラ粉末0.3gに、60%、80%、又は100%エタノール60mlを加えた後、60℃で1時間加熱還流した。抽出液を1500rpmで20分間遠心分離し、上清を減圧下で濃縮して完全にエタノールを除去して、粗抽出物を得た。60%、80%、及び100%エタノールを用いた抽出により得られた粗抽出物の乾燥重量は、各々65mg、42mg、18mgであった。これらの粗抽出物が3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを含むことを、薄層クロマトグラフィーで確認した。

【0058】

【製造例3】

アロエベラの葉肉（透明ゲル部分）を加熱乾燥し、粉碎した乾燥アロエベラ粉末0.3gに、水60mlを加えた後、95℃で5時間加熱還流した。抽出液を1500rpmで20分間遠心分離し、上清を凍結乾燥して、75mgの粗抽出物を得た。この粗抽出物が3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを含むことを、薄層クロマトグラフィーで確認した。

【試験例1】

本試験は、3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールの高血糖状態の改善効果を評価するために行った。

【0059】

(1) 試料の調製

前記製造例 1 で製造した 3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを試験試料とした。

#### 【0060】

##### (2) 試験方法

II型糖尿病モデルマウスとして、6週齢、雄性db/dbマウス（日本クレア社より購入）を使用した。前記マウスを1群7匹に群分けした。試験試料をDMSOに溶解した後、生理食塩水にて、3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールの濃度を15  $\mu$ g/mlに調整した。最終DMSO濃度は、0.2%に調整した。前記II型糖尿病モデルマウスに1日1回ゾンデを用いて試験試料溶液を1mlずつ連日経口投与した。陰性試料としてDMSOの生理食塩水溶液（0.2%）を、モデルマウスに投与した。空腹時血糖値および、通常血糖値は、アントセンスII（バイエル三共社製）にて経時的に測定した。空腹時血糖値は、15時間の絶食の後に測定を行った。

#### 【0061】

##### (3) 高血糖改善効果

図3および図4に、通常血糖値、および空腹時血糖値の試験試料投与期間中の経時的变化を示す。陰性試料を投与したマウスでは、通常血糖値及び空腹時血糖値のいずれにおいても急激な血糖値の上昇が観察されたが、試験試料を連続投与したマウスにおいては、明らかに血糖値の上昇を抑制する効果が観察された。

#### 【0062】

##### 【試験例2】

本試験は、3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールのヘモグロビンA1cの降下作用を評価するために行った。

#### 【0063】

##### (1) 試料の調製

前記製造例 1 で製造した 3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを試験試料とした。

#### 【0064】

##### (2) 試験方法

II型糖尿病モデルマウスとして、6週齢、雄性db/dbマウス（日本クレア社より購入）を使用した。前記マウスを1群7匹に群分けした。試験試料をDMSOに溶解した後、生理食塩水にて、3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールの濃度を1、5、15  $\mu$ g/mlに調整した。最終DMSO濃度は、0.2%に調整した。前記II型糖尿病モデルマウスに1日1回ゾンデを用いて各試験試料溶液を1mlずつ連日経口投与した。陰性試料としてDMSOの生理食塩水溶液（0.2%）を、モデルマウスに投与した。投与開始から35日目に、ヘモグロビンA1cをDCA2000（バイエル三共社製）にて測定した。

#### 【0065】

##### (3) ヘモグロビンA1c降下作用

投与開始から35日目のヘモグロビンA1cの測定結果を表1に示す。陰性試料を投与したときのヘモグロビンA1cの値に比べ、5又は15  $\mu$ gの試験試料の連続投与では、統計学的に有意なヘモグロビンA1cの低下が見られ、長期間での血糖値コントロール効果があることが示された。また、投与期間中、副作用の症状および投与後低血糖状態を引き起こした例は一度もなく、体重および病理的な所見からも異常は認められなかった。

#### 【0066】



表 1

試料	投与 3 5 日目	
	血中ヘモグロビンA1c相対値 (%)	p値
試験試料 (1 $\mu$ g)	98.6 $\pm$ 7.3	
試験試料 (5 $\mu$ g)	89.6 $\pm$ 7.9*	0.017
試験試料 (15 $\mu$ g)	73.5 $\pm$ 8.6*	0.00001
陰性試料	100	

\*：統計学的に有意差が認められた。

【0067】

〔試験例 3〕

本試験は、アロエベラ由来の 3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを含む抽出粗精製物 A のヘモグロビンA1cの降下作用および投与量の検討を行うために行った。

【0068】

(1) 試料の調製

前記製造例 1 で製造した 3-O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オールを含む抽出粗精製物 A を用いた。

【0069】

(2) 試験方法

II型糖尿病モデルマウスとして、6週齢、雄性db/dbマウス（日本クレア社より購入）を使用した。前期マウスを1群7匹に群分けした。試験試料をDMSOに溶解した後、生理食塩水にて、抽出粗精製物 A の濃度を25、100、200  $\mu$ g/ml に調整した。最終DMSO濃度は、0.2%に調整した。前記II型糖尿病モデルマウスに1日1回ゾンデを用いて各試験試料溶液を1ml ずつ連日経口投与した。陰性試料としてDMSOの生理食塩水溶液（0.2%）を、モデルマウスに投与した。投与開始から35日目にヘモグロビンA1cをDCA2000（バイエル三共社製）にて測定した。

【0070】

(3) 血糖値およびヘモグロビンA1c値

投与開始から35日目のヘモグロビンA1cの測定結果を表2に示す。陰性試験のヘモグロビンA1cの値に比べ、100又は200  $\mu$ gの試験試料の連続投与では、ヘモグロビンA1cの低下が見られ、統計学的有意に長期間での血糖値コントロール効果があることが示された。また、投与期間中、副作用の症状および投与後低血糖状態を引き起こした例は一度もなく、体重および病理的な所見からも異常は認められなかった。

【0071】

表 2

試料	投与 3 5 日目	
	血中ヘモグロビンA1c相対値 (%)	p値
試験試料 (粗精製物 25 $\mu$ g)	92.5 $\pm$ 7.1	0.1571
試験試料 (粗精製物 100 $\mu$ g)	84.9 $\pm$ 8.2*	0.0275
試験試料 (粗精製物 200 $\mu$ g)	82.0 $\pm$ 8.6*	0.0129
陰性試料	100	

\* : 統計学的に有意差が認められた。

## 【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

【図 1】 本発明の配糖体のアグリコン部のアセチル化体の GC-MS スペクトル。

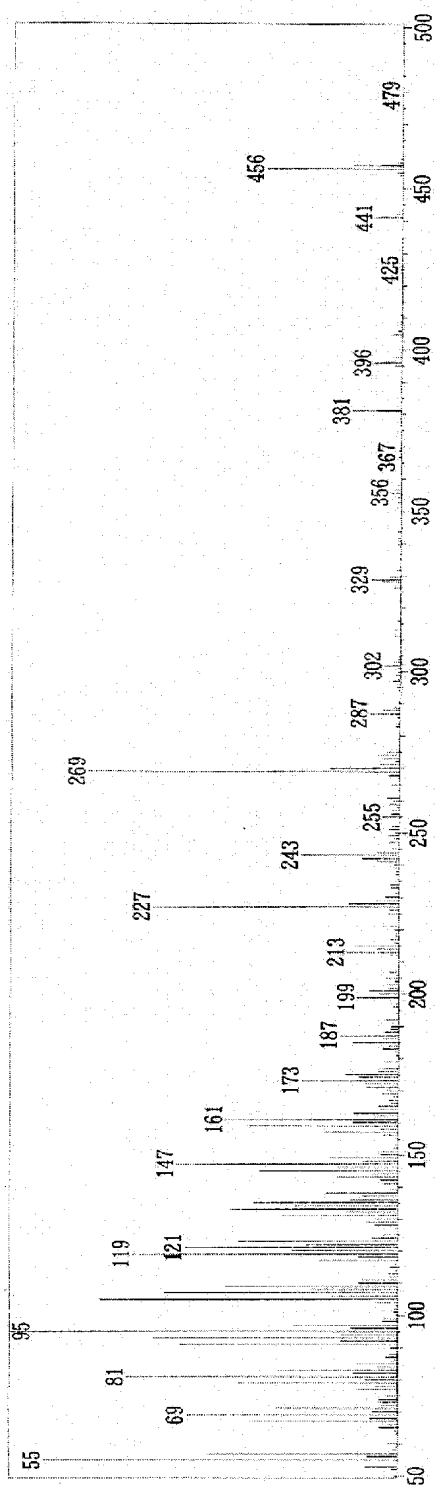
【図 2】 本発明の配糖体のアグリコン部のアセチル化体の  $^{13}\text{C}$ -NMR チャート。

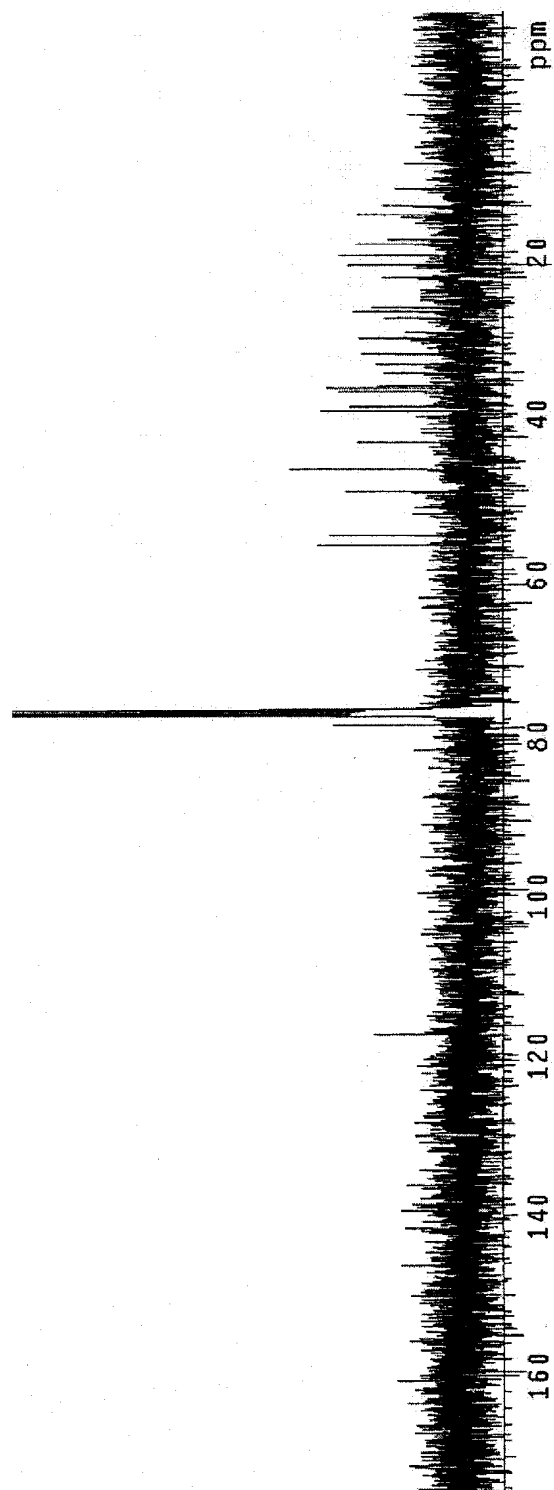
【図 3】 本発明の化合物を投与したマウスの通常血糖値の経時的変化を示す図。

【図 4】 本発明の化合物を投与したマウスの空腹時血糖値の経時的変化を示す図。

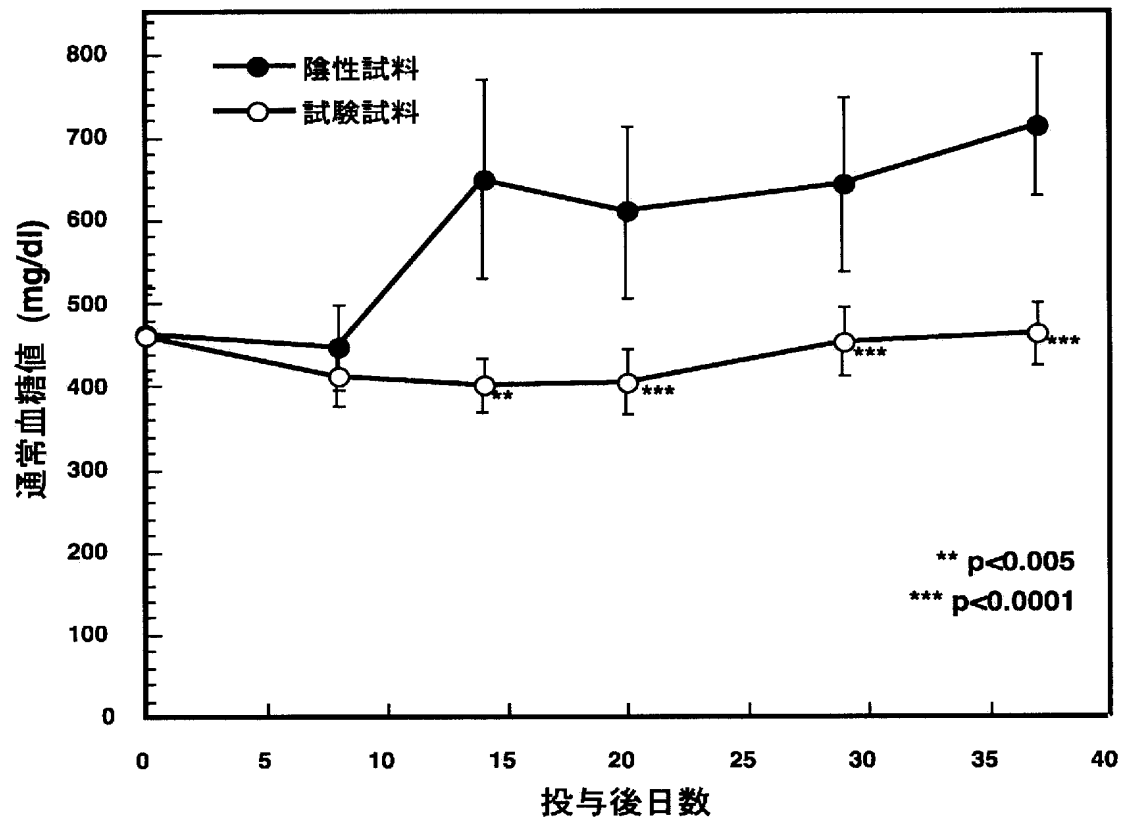
【書類名】 図面

【図 1】

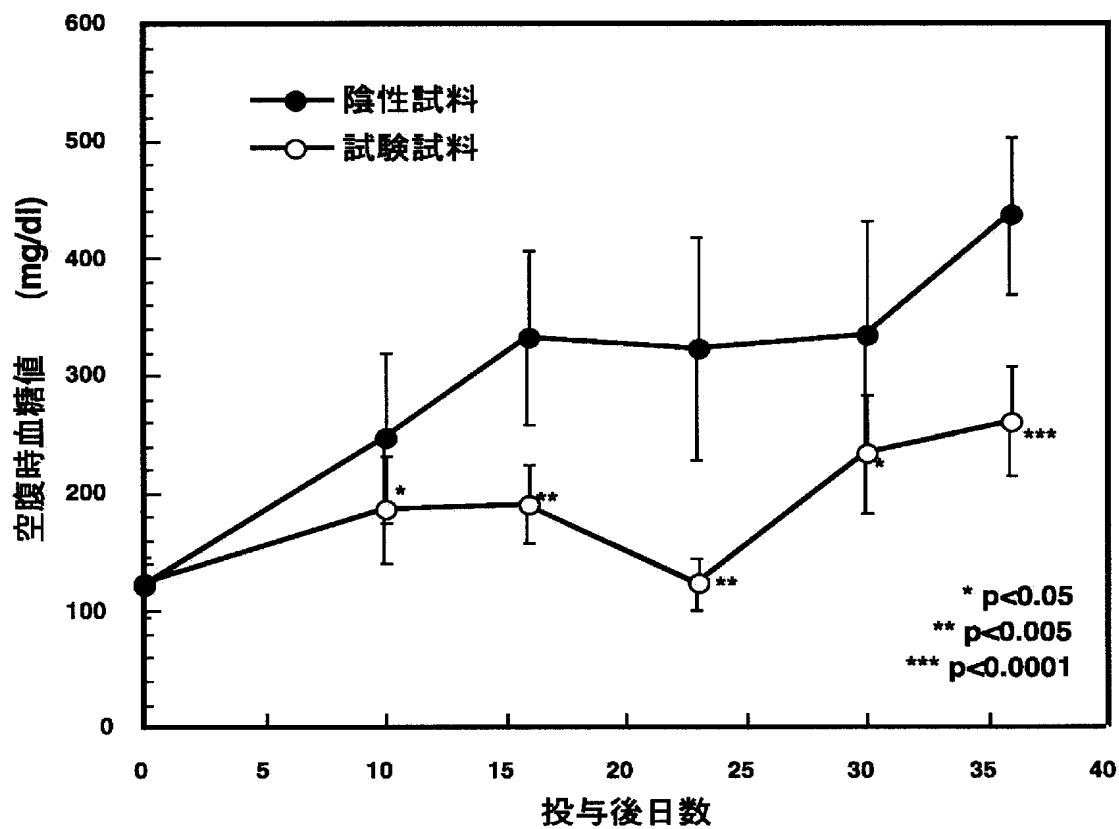




【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 低血糖を引き起こさず安全に摂取でき、かつ、ヘモグロビンA1c値を低下させる、長期血糖値コントロール作用を持つ化合物及びそれを含む高血糖改善剤を提供する。

【解決手段】 3-O-β-D-グルコピラノシル-4-メチルエルゴスト-7-エン-3-オール、又は同化合物を含むユリ科植物の抽出物又はその分画物であって、前記化合物を1質量%以上含む組成物を、高血糖改善剤の有効成分とする。

【選択図】 図3

## 出願人履歴

0 0 0 0 0 6 1 2 7

19900906

新規登録

東京都港区芝5丁目3番1号

森永乳業株式会社